

酵母のストレス応答とカルシニューリン

——細胞内イオン濃度の調節による高NaClへの適応——

宮川都吉・中村太郎・平田 大

カルシニューリンは、酵母の通常の増殖には必須でなかったが、細胞内イオンのホメオスタシスに関与し、ある種のイオンが関係するストレス条件下の増殖には必要であった。高NaClを含む培地では、細胞内Na⁺が上昇しK⁺が低下するが、これに抗してイオン濃度を正常化するのにカルシニューリンが必要であった。興味深いことに、この系はT細胞活性化のプロセス同様、免疫抑制剤FK506感受性で、阻害にはFK506結合蛋白質FKBPが必要であった。カルシニューリンを介するシグナル伝達系のFK506による阻害機構は、酵母から高等動物まで非常に保存性が高いと考えられる。

はじめに 細胞内のカルシウムイオン (Ca²⁺) は細胞周期、ホルモン分泌、筋収縮、グリコーゲン代謝、受精、イオン輸送など真核細胞におけるさまざまなプロセスの調節に重要な役割を果たしている。細胞内のCa²⁺濃度は通常2~4×10⁻⁷Mときわめて低く維持されているが、細胞外からの流入あるいは細胞内プールからの動員により、細胞内の遊離Ca²⁺濃度が一時的に急上昇することが一連の応答の引き金になっていると考えられている¹⁾。Ca²⁺シグナル伝達の媒体として重要な蛋白質にカルモジュリン(CaM)がある。CaMは分子量約17Kの酸性蛋白質で、真核生物に普遍的に存在する保存性の高いCa²⁺結合蛋白質である。動物細胞には数多くのCa²⁺/CaM依存性の活性が知られており、Ca²⁺/CaMはこれらの標的蛋白質への特異的結合を通じて細胞の機能調節にかかわっていると予想されているが^{2,3)}、これらの蛋白質の生理機能はまだほとんど明らかになっていない。酵母の細胞内Ca²⁺濃度も動物細胞と同程度の低濃度に維持されており⁴⁾、*Saccharomyces cerevisiae*と*Schizosaccharomyces pombe*では、CaMが増殖

に必須なことが明らかにされている⁵⁻⁷⁾。CaMがCaM結合蛋白質の機能調節を通じて細胞機能をどのように制御しているかは大変興味深い。酵母のCa²⁺/CaM結合蛋白質の機能を解析することにより、Ca²⁺/CaMによるシグナル伝達系が明らかになると期待される。酵母にも多種のCaM結合蛋白質が存在する⁸⁾。そこで、CaM結合蛋白質をコードする酵母遺伝子のクローニングとその解析を行なった。

I. CaM結合蛋白質遺伝子のクローニング⁹⁾

CaMにより活性化される各種酵素の解析から、CaMは約20個のアミノ酸からなる両親媒性αヘリックスにCa²⁺依存的に結合することが明らかにされている。CaMの機能を利用したCaM結合蛋白質遺伝子のスクリーニング法を開発し、クローニングを行なった。λgt11をベクターとする酵母の発現ライブラリーをスクリーニングして、Ca²⁺依存的に¹²⁵I標識CaMを結合するプラークを選択した。この方法により、CaM結合領域を有

Tokichi Miyakawa, Taro Nakamura, Dai Hirata, 広島大学工学部 (〒724 東広島市鏡山1-4-1) [Department of Fermentation Technology, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 724, Japan]

Calcineurin-Mediated Adaptation to Salt Stress in Yeast

Key words 【カルシニューリン】【イオンホメオスタシス】【免疫抑制剤】【*Saccharomyces cerevisiae*】

する結合蛋白質が検出できる。得られたファージを大腸菌に感染させて熱誘導により生産される融合蛋白質が、実際に CaM を結合することが SDS ゲル電気泳動により確認された。得られた 2 種クローンについて塩基配列の決定を行なったところ、いずれも CaM 結合領域と予想される配列を含んでいたため *CMP1* および *CAP2* と名づけた。1,162 bp の ORF を含む *CAP1* は分子量 63 K の、また 1,812 bp の ORF を含む *CAP2* は分子量 69 K のの蛋白質をコードしていた。予想されるアミノ酸配列におおの 23 個のアミノ酸からなる CaM 結合領域と推定される両親媒性 α ヘリックスの特徴的なモチーフが存在した。*CAP1* および *CAP2* 遺伝子産物間のアミノ酸の同一性は 65% で、いずれも全長にわたり哺乳類のカルシニューリン (2B 型プロテインホスファターゼ; PP2B) (図 1) の触媒サブユニットと高い相同性をもつことが明らかになった。ラット・カルシニューリン (*CNA α*)¹⁰⁾ に対する *CMP1* および *CMP2* の相同性はそれぞれ 52% および 53% であった (図 2)。今回用いた方法で得られたクローンは、この 2 種類の遺伝子を含むものばかりであった。スクリーニングの過程で、CaM に対しとくに高い親和性の結合領域をもつものばかりが選択された可能性がある。この方法により新たな遺伝子を取得するためには、さらにスクリーニングの条件を改良する必要がある。筆者らのものと同じ 2 つの遺伝子は、少し遅れて別のグループからも報告された^{11,12)}。

大腸菌に生産させた β -ガラクトシダーゼと *Cmp1p* お

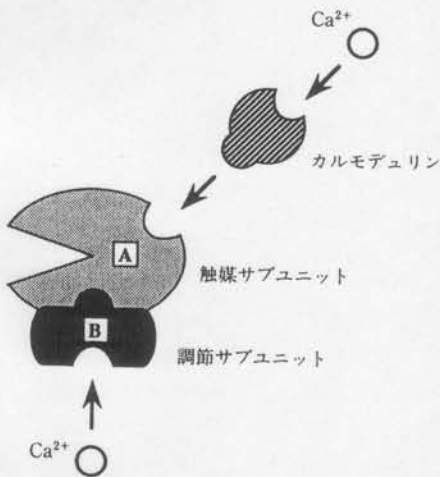


図 1. 哺乳動物の PP2B (カルシニューリン) のサブユニット構造

よび *Cmp2p* との融合蛋白質により、ウサギを免疫して抗 *Cmp1p* および抗 *Cmp2p* 抗体を作製した。この抗体を利用した酵母蛋白質のウェスタンブロッティングにより、62 K および 64 K の蛋白質が検出された (図 3)。また、¹²⁵I 標識 CaM によるゲルオーバーレイ法によって、これらの蛋白質が実際に CaM 結合蛋白質であることを確認した (図 4)。

PP2B はとくに脳神経系の組織に多く含まれ、カルシニューリンともよばれている¹³⁾。カルシニューリンは図 1 に示すように、触媒サブユニット (A) と調節サブユニット (B) からなる。B サブユニットもまた Ca²⁺ 結合蛋白質であるので、触媒サブユニットは 2 種類の Ca²⁺ 結合蛋白質により活性の調節を受けていると予想されるが、2 段階の調節の生理的意義などは明らかでない。また A 鎖の C 末端付近もとくに保存性が高く、内在性の阻害領域と予想されている。

酵母では、ほかの型のプロテインホスファターゼの活性が強いため Ca²⁺ 依存性プロテインホスファターゼの活性測定は困難で、酵母に PP2B が存在するかどうか明らかでなかった。そこで、細胞抽出液から DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー、CaM アフィニティークロマトグラフィーおよびヘパリンセファロースクロマトグラフィーにより分画し (抗体で検出)、ホスファターゼ活性を測定した。活性は ³²P 標識したカゼインから遊離する ³²P により測定した。その結果、Ca²⁺/CaM により約 10 倍活性化されるホスファターゼが検出された (図 5)。この活性は酵母由来のほかのホスファターゼ (PP1 および PP2A) が感受性を示す 0.1 μ M のオカダ酸ではほとんど阻害されなかった。この性質は、動物由来の PP2B が PP1 および PP2A に比べてオカダ酸に対する感受性がはるかに低いことともよく一致している。

II. PP2B の生理機能の解析^{9,14,15)}

PP2B の生理機能を理解するために、A 鎖 (触媒サブユニット) をコードする遺伝子の破壊株 (Δ *cmp1*, Δ *cmp2*, Δ *cmp1 \Delta**cmp2*) を構築し、変異が生育に与える影響を調べた。酵母の PP2B は、高等生物のそれと構造的および機能的に非常に類似していることから、Ca²⁺ が関与する細胞の基本機能にかかわっていることが期待され、遺伝子破壊は通常の生育に重篤な影響を与えるものと予想した。しかし、 Δ *cmp1 \Delta**cmp2* 二重

CMP1		M	S	K	D	L	N	S	R	I	K	I	K	P	N	D	S	Y	I	K	V	D	R	K	K	D	L	28
CMP2	MSSDAIRNTEQINAAIKIIENKTERPQS	S	T	T	P	I	D	S	K	A	S	T	Y	A	A	N	S	-	T	A	T	E	T	S	R	D	L	54
CNA α	MSEPKAIDPKLSTTRVYKAVPFPSSHRLTAKEVFD-NDGKPRVDILKHALMKEGRLEES	29																										
CMP1	TKYFELENGKVIKSTKDRPIASVPAITGKIFSDDEEVFDSKTGLPNISFLREHFFIIEGRISKE	88																										
CMP2	TQYTLDDGRVYSTNRRIIMNKVPAITSHYPTDEDFVFG-PNGIPRHEFLRDHFKRREGRLSAA	113																										
CNA α	VALLRIITTEGASILURQEKNLDDIDAPYTVCGDIHGQEFDLMKLFEVGGSPANTRYLFLGDY	119																										
CMP1	QALKILNMSITYALSKEPNLLKAKAPITICGDIHGQYFDLLKLFVGGDPAEIDYLFGLDY	148																										
CMP2	QAARIYTLAELFSKEPNLISYPAPITVCGDIHGQYFDLLKLFVGGDPAITTSYLFGLDY	173																										
CNA α	VDRGYFSIECVIYIWAALKLILYPKTLFLLRGNHECRHLTEYVTFKQGECKIKYSERVYDACM	179																										
CMP1	VDRGAFSFECLIIYLSLKLNLGRFWMIRGNHECKHLTSYTFKNEMLHKYDMEVYDACC	208																										
CMP2	VDRGSFSFECLIIYLSLKLNLNDHFLLRGNHECKHLTSYTFKNEMLHKYNLDIYVEKCC	233																										
CNA α	DSFDCLPLAALMNQQEFVGHGGISPELINTLDDIRKLDRFKPEPPAYGPMCDLWSDPLEDF	239																										
CMP1	RSFNVLPLAALMNGQYFCVHGGISPEIKSVYEDVYKINRFRPEPSRGLMCDLLWADPVENY	268																										
CMP2	ESFNVLPLAALMNGQYLCVHGGISPELNSLQDINNLRFRPEPSHGLMCDLLWADPLEEY	293																										
CNA α	GNEK-----TQEHFTHTNTVRGCSYFYSYPAVVCDFLQHNNL	274																										
CMP1	DDAR---DGSIEFDQ-----SEDEFVFNLSLRGCSFAFTFKASCKFLKANGI	310																										
CMP2	-DEVLDKDLIEEDIVNSKTMVPHHGKMAPSRDMFVFNVSVRGCSYAFTYRAACHFLQETGL	352																										
CNA α	LSTLRAHEAQQDAGYRMYRKSQTTFGPSLITLFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENNVNIRQF	334																										
CMP1	LSTLRAHEAQQDAGYRMYKNNKVTGFPSSLITMFSAPNYLDTYHNNKAAVLKYENNVNIRQF	370																										
CMP2	LSTLRAHEAQQDAGYRMYKNTKLTGFPSSLITLFSAPNYLDTYNNKAAVLKYENNVNIRQF	412																										
CNA α	NCSPHPYWLPNFMVDVFTWSPFVGEKVTMLVNVYLNICSDDELGSEEDGFDGATAA---	391																										
CMP1	IMSPPHYWLPDFMVDVFTWSPFVGEKVTSMYLSILNICSEQELDPESEPKAAEETVKARA	430																										
CMP2	NMTTPHYWLPDFMVDVFTWSPFVGEKVTMLVAIYLNICTEDELNDTPVIEELVGTDKKL	472																										
CNA α	-----RKEVIRNKIRAIQKMARVYFVILREESESVLTL	423																										
CMP1	-NAITRETGTPSDEKAS---SAILDEDETRRKALRNKILAIKVSRYMFSVILREESEKVEYL	485																										
CMP2	PQAGKSEAATPQPATSASPKHASILUDEHRRKALRNKILAVAKVSRMYSVLREEETNKVQFL	532																										
CNA α	KGLTPTIGMLPSGVLSGGKQTLQSAITVEAIEADEAIGKGFSPQHKITSFEAKGLDRINERM	483																										
CMP1	KT-MNAGVLPARGALARGTEGLNET-----LSTFEKARKEDIINEKL	525																										
CMP2	KD-HNSGVLPARGALSNGVKGIDEA-----LSTFERARKHDLINEKL	572																										
CNA α	PPRRDAMPSDANLNSINRAIASETNGTDSNGSNSNINQ	521																										
CMP1	PPSLSEY-EQEKLKYYEKILKGAEKKPQL	554																										
CMP2	PPSLDEL-KNENKYYEKYVWQKVIIHDAKNDISK	604																										

図 2. *CMP1* および *CMP2* とラット・カルシニューリン A (*CNA α*) のアミノ酸配列の比較

同一アミノ酸を枠で囲んで示した。太い線で示した配列は予想されるカルモデュリン結合領域を、また▼で示した配列は予想される阻害領域を示している。

破壊を含まない変異も、増殖速度、細胞形態、窒素飢餓感受性、 α 因子感受性、性接合能、胞子形成能のすべてにおいて正常であり、2つの遺伝子とも通常の生育には必須でないことが示された¹⁴⁾。ここでひとつの可能性として、触媒ユニットをコードする第3の遺伝

子が存在し、これが *CMP1* および *CMP2* の欠損を相補するために、遺伝子破壊の影響が表われないということが考えられる。そこで、この可能性を遺伝学的ならびに生化学的に検討することにした。

まず、*CMP2* をプローブとして緩い条件下でサザン

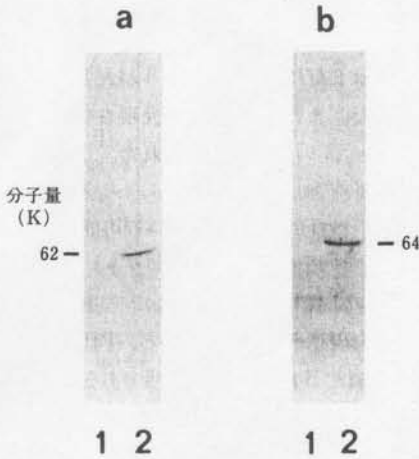


図 3. 酵母細胞抽出液中の *CMP1* および *CMP2* 遺伝子産物のウェスタンブロットによる同定

a および b はそれぞれ抗 *Cmp1p* 抗体または抗 *Cmp2p* 抗体により検出した。1 および 2 は、それぞれ $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株および *CMP1 CMP2* (野生株) から調製した。

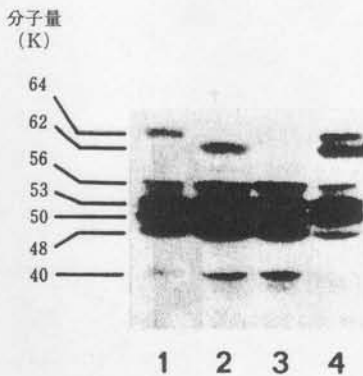


図 4. ^{125}I 標識カルモデュリンを利用したゲルオーバーレイ法により検出した各種遺伝子破壊株のカルモデュリン結合蛋白質

1: $\Delta cmp1 \Delta cmp2$, 2: *CMP1* $\Delta cmp2$, 3: $\Delta cmp1 \Delta cmp2$, 4: *CMP1 CMP2*.

解析を行なったが *CMP1*, *CMP2* 以外の類似遺伝子は検出されなかった。また各型のプロテインホスファターゼ (PP1, PP2A および PP2B) に種を越えて完全に保存されている配列と、各種生物の PP2B すべてに特異的に保存されている配列をもとにデザインした合成プライマーを用いて PCR 法により検索を試みた (図 6)。しかし、この方法によっても新規な相同遺伝子は得られなかったため、酵母には PP2B 触媒サブユニットをコードする遺伝子はこれら 2 つ以外には存在しないこ

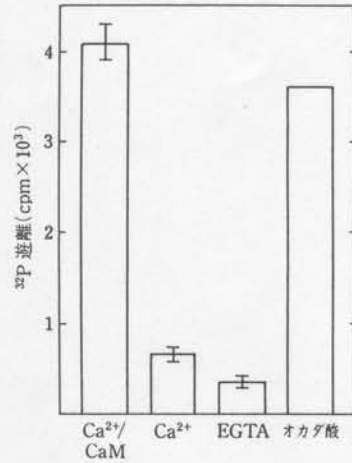


図 5. 酵母の Ca^{2+} 依存性プロテインホスファターゼ部分精製標品 (ヘパリンセファロースカラム後の P1 画分; 図 7) を ^{32}P 標識カゼインを基質としてホスファターゼ活性を測定した。

とが示された。このことをさらに生化学的に確認するために、 $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株から、前述の方法に従い精製した画分のホスファターゼ活性を調べたが、PP2B 活性は検出されなかった (図 7)。図 7 の P3 画分には弱い活性がみられるが、この活性は Ca^{2+} 非依存性でオキサゲ酸に感受性であったことから、PP2B とは異なるホスファターゼによるものと考えられる。以上の解析から、*CMP1* および *CMP2* は実際に PP2B サブユニットをコードしており、また酵母の通常の増殖には PP2B は必須ではないと結論した¹⁴⁾。

それでは、酵母 PP2B はいかなる生理機能をもっているのか? 筆者らは、さらに $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株について、種々のストレスに対する感受性を調べた。その結果、二重破壊株は、1.2 M NaCl, 140 mM LiCl および 5 mM バナジン酸に感受性を示し (図 8), pH 8.0 以上のアルカリ条件下で著しく生育が抑えられることがわかった (図 9)¹⁵⁾。高濃度の CaCl_2 , MgCl_2 , KCl ならびに糖による高浸透圧に対するトレランスにはまったく影響がみられなかった。また、0.2 M KCl の添加によって、破壊株の NaCl および LiCl 感受性は抑圧されたが (図 8), バナジン酸感受性およびアルカリ条件下での生育抑制は抑圧されなかった。一方、A 鎖蛋白質をコードする 2 つの遺伝子 *CMP1* または *CMP2* のいずれか一方を破壊した株では、*CMP2* の破壊株がやや弱いながらも二重破壊株と同様の表現型を示すこ

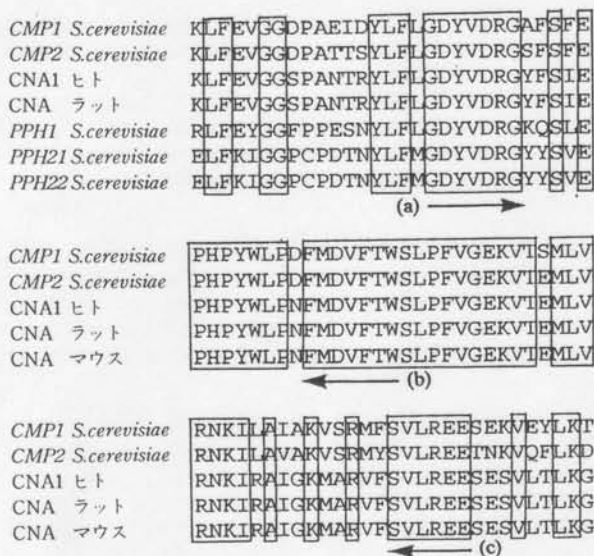


図 6. PCR 法による *CMP1* および *CMP2* 相同遺伝子の検索
 センス鎖プライマー (a) は、3 種類のセリン/スレオニン型プロテイン
 ホスファターゼ (PP1, PP2A および PP2B) のすべてに種を越えて完全
 に保存されているアミノ酸配列を利用して、またアンチセンス鎖プライ
 マー (b および c) は、各種生物の PP2B の調節領域に完全に保存されて
 いるアミノ酸配列を利用して作製した。保存されているアミノ酸は枠で
 囲って示した。

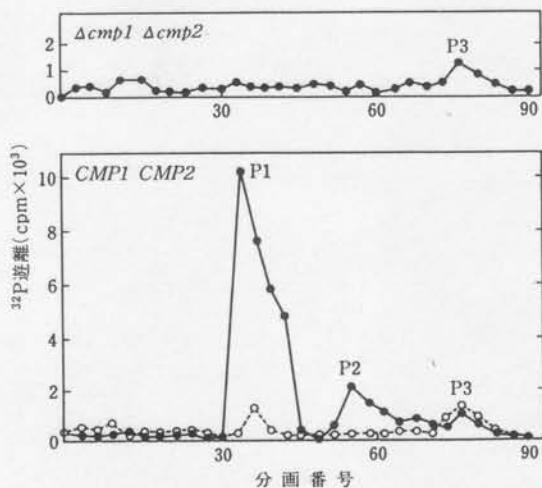


図 7. $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株の PP2B 活性

親株および $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株から調製した酵素標品の
 のヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィー後の各分画
 のホスファターゼ活性をカルモジュリンと Ca^{2+} (●) および EGTA
 (○) 存在下に測定した。

と、 $\Delta cmp1$ 株は有意な表現型を示さないこと
 から、NaCl および LiCl に対するトレランス
 には *CMP2* の寄与のほうが大きいことがわか
 った。また *CMP1* を高発現させることにより
 $\Delta cmp2$ の形質は相補された。これから、両遺
 伝子産物は部分的にオーバーラップしながら
 も、機能的に分化している可能性が示唆され
 た。B 鎖 (調節サブユニット) をコードする
 $\Delta cnb1$ 株は $\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株と同様
 の表現型を示したことから、PP2B の機能には
 A 鎖と B 鎖の両方が必要であると考えられる。
 以上に述べた実験の結果から、酵母の PP2B
 は細胞内イオンのホメオスタシスに関与して
 おり、細胞内イオンに影響を及ぼすストレス
 条件下の生育には必須の機能を果たしている
 ことが明らかになった。

$\Delta cmp1 \Delta cmp2$ 二重破壊株は NaCl および
 LiCl に対して感受性を示した。この表現型は、
 破壊株の Na^+ 輸送系の欠陥により細胞内の
 Na^+ 濃度が異常に高くなったことによる可能
 性が考えられる。Li⁺ は Na⁺ のアナログであ
 り、同じ輸送系を通り移動すると考えられて

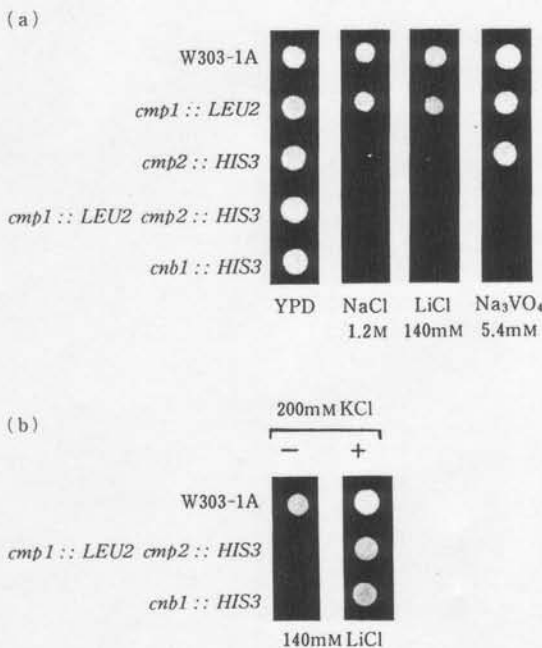


図 8. PP2B に関する各種破壊株の増殖

(a) 1.2 M NaCl, 140 mM LiCl または 5.4 mM Na_2VO_4 を含
 む寒天プレート上での生育。(b) LiCl による増殖阻害の KCl
 による回復。

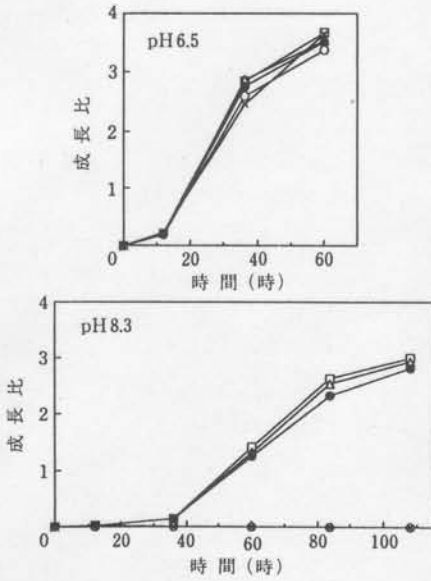


図 9. PP2B サブユニットに関する各種破壊株の高 pH における増殖
pH 6.5 および pH 8.3 における野生株 (●), $\Delta cnp1$ 株 (□), $\Delta cnp2$ 株 (△), $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株 (○), $\Delta cnp1$ 株 (×) の増殖を比較した。

いる。対数増殖期の細胞に最終濃度 0.85 M (破壊株でも弱いながら生育可能な濃度) になるように NaCl を添加した培地で増殖する細胞から経時的に抽出液を調節し、 Na^+ および K^+ 濃度を測定した (図 10)。測定は複数のイオンを同時にしかも定量的に測定可能な等速電気泳動法により行なった。野生株でも細胞内 Na^+ 濃度は、NaCl 添加後の初期に破壊株と同様に急激に上昇したが、3 時間後に野生株の細胞内 Na^+ 濃度が低下しはじめたのに対し、破壊株での低下はこれより遅れ、また低下の速度も遅かった。細胞内の Na^+ 濃度が低下してはじめて細胞の増殖が開始したことから、高レベルの細胞内 Na^+ は細胞の増殖にとり毒であり、PP2B は高 NaCl 培地で増殖する際に細胞内の Na^+ 濃度を低下させるのに必須の役割を果たしていると考えられる。破壊株においても細胞内の Na^+ 濃度の低下がみられたことから、酵母には PP2B 依存性の細胞内 Na^+ 濃度調節機構以外に非依存性の機構も存在すると考えられる。

一方、細胞内 K^+ 濃度は野生株、破壊株ともに最初急速に低下するが、その後、野生株では一定レベルに保たれるのに対し、破壊株ではその後も低下しつづけ、10 時間後には野生株の約半分のレベルになった。寒

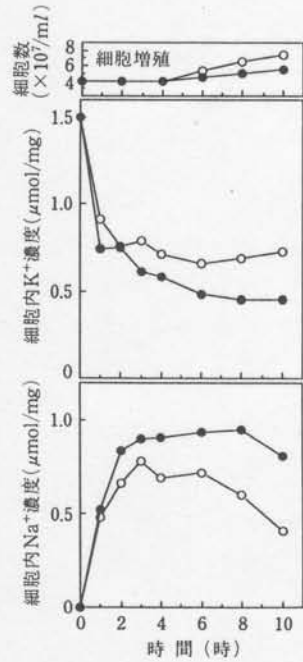


図 10. 高 NaCl (0.85 M) を含む培地に移した野生株 (○) および $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株 (●) の増殖ならびに細胞内 Na^+ および K^+ 濃度の変動

天平板培地上で破壊株の NaCl 感受性は 0.2 M KCl の添加によって抑圧される。そこで、細胞内の Na^+ および K^+ の挙動に対する KCl 添加の効果について調べた。0.85 M NaCl 存在下で 6 時間培養後の細胞内イオンについて測定した (図 11)。KCl の添加によって破壊株の Na^+ 濃度は 46% に減少し、また K^+ 濃度は 2.3 倍に上昇し、NaCl 培地における野生株の細胞内イオンのレベルに近づいた。この効果は野生株においてもみられ、細胞内 Na^+ 濃度は低下し、 K^+ 濃度は上昇する。この結果は、NaCl を含む平板培地上での野生株の増殖が KCl により促進されることと一致する。

破壊株で NaCl 添加後の細胞内 Na^+ 濃度の低下が遅いことは、 Na^+ 排出系に異常が生じた可能性が考えられる。そこで、 Na^+ の排出能を比較した。0.85 M NaCl 存在下に 4 時間培養して細胞内 Na^+ の濃度を高めた細胞を NaCl を含まない培地に移し、細胞内の Na^+ 濃度を経時的に測定した (図 12)。野生株では速やかに減少するのにに対し、破壊株では減少が緩慢であったことから、 Na^+ の排出に欠陥があることが示唆された。0.2 M KCl を添加することによって Na^+ 排出の低下は野生株のレベルまで回復した。

以上の実験から、PP2Bは Na^+ 排出機能の調節および細胞内 K^+ レベルの維持によりストレス条件下のイオンホメオスタシスに関与していることが示された。動物細胞の細胞内イオンの調節に重要な Na^+ 、 K^+ -ATPaseは酵母では報告されておらず(おそらく存在しない)、細胞内 Na^+ および K^+ 濃度調節の分子機構の研究は、まだ緒についたばかりの段階なので、PP2Bを介するストレス応答の機構もまだまったく不明である。PP2Bによる脱リン酸化反応が遺伝子発現のレベルで作用しているのか、あるいはイオン輸送系蛋白質に直接作用しているのかを明らかにすることは重要な課題で

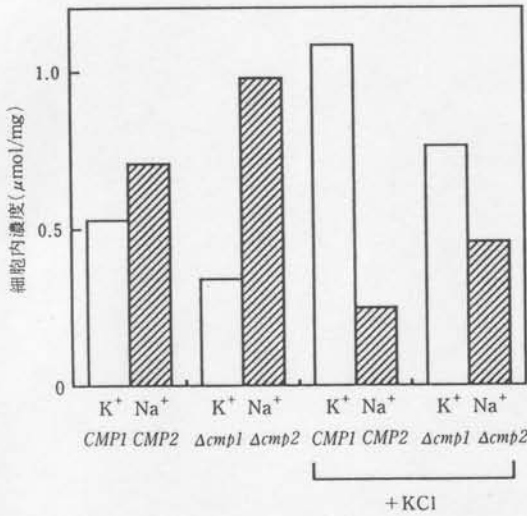


図 11. 野生株および $\Delta\text{cmp1} \Delta\text{cmp2}$ 二重破壊株の細胞内の Na^+ および K^+ 濃度に及ぼす KCl の効果

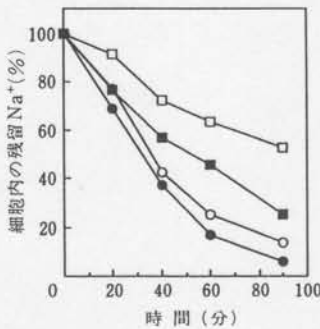


図 12. 細胞内の Na^+ の排出

野生株 (○, ●) および $\Delta\text{cmp1} \Delta\text{cmp2}$ 二重破壊株 (□, ■) をあらかじめ高 NaCl 培地で細胞内 Na^+ を高めておき、KCl を含む (●, ■) または含まない (○, □) YPD 培地に移し、経時的に細胞内 Na^+ を測定した。

ある。

また最近、酵母の PP2B を解析している別のグループから、酵母が α 因子による増殖停止から回復する際に PP2B が必要なことが示された^{11,12)}。

III. 免疫抑制剤 FK506 による PP2B 生理機能の阻害¹⁵⁾

臓器移植の際の拒絶反応を抑えたり、自己免疫疾患の治療などに使用される免疫抑制剤 FK506 は、T 細胞活性化の初期段階に作用し、インターロイキン 2 などのサイトカイン遺伝子の転写発現を阻害することによって強力な免疫抑制効果を発揮する。FK506 は、細胞内の結合蛋白質 (FKBP) と複合体 (FK506-FKBP) を形成して、これがさらに PP2B に結合することによりホスファターゼ活性を阻害し、このことが免疫抑制の機構であることが示された¹⁶⁻¹⁸⁾。免疫情報伝達系における PP2B は、免疫抑制剤のターゲットとして、また細胞膜におけるイベントと核におけるイベントをつなぐ役割を担う鍵酵素として注目されている (図 13)。

酵母にも、免疫抑制剤に対する特異的結合蛋白質 yFKBP-12 が存在するので¹⁹⁾、PP2B が関係する酵母のストレス応答も免疫抑制剤による阻害を受けるかどうかは興味深い。免疫抑制剤の作用は、PP2B が必須な役割を果たしている現象を利用してはじめて検出可能になる。そこで、LiCl トレランスには PP2B が関与していることを利用して、野生株の LiCl 存在下の増殖に及ぼす FK506 の影響について調べた (図 14b)。培地に

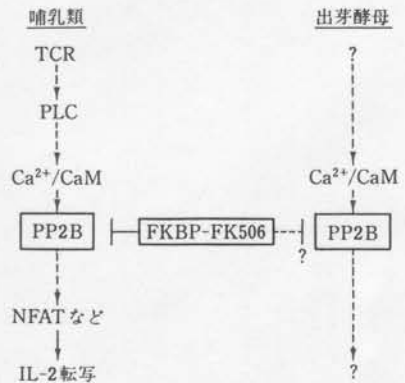


図 13. 免疫抑制剤 FK506 による PP2B の阻害と T 細胞受容体を介するシグナル伝達の阻害

TCR: T 細胞受容体, PLC: ホスホリパーゼ C, NFAT: T 細胞活性化因子, IL-2: インターロイキン 2, FKBP: FK506 結合蛋白質。

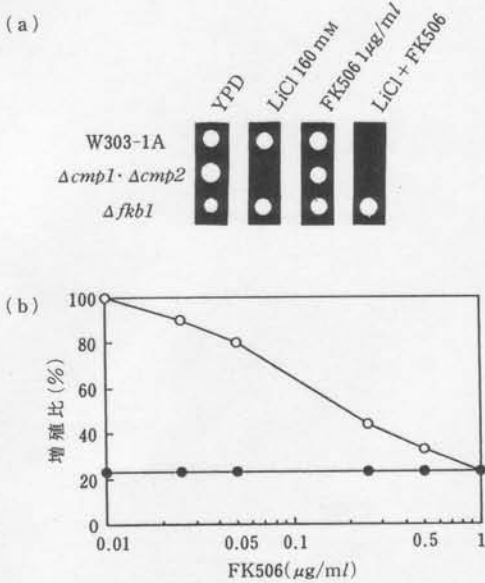


図 14. 高塩培地への適応に及ぼす免疫抑制剤 FK506 の効果

(a) LiCl を含む培地における野生株, $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株および $\Delta fkb1$ 株の増殖に及ぼす FK506 の効果。

(b) 50 mM LiCl および各種濃度の FK506 を含む培地での野生株 (○) および $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株 (●) の増殖。

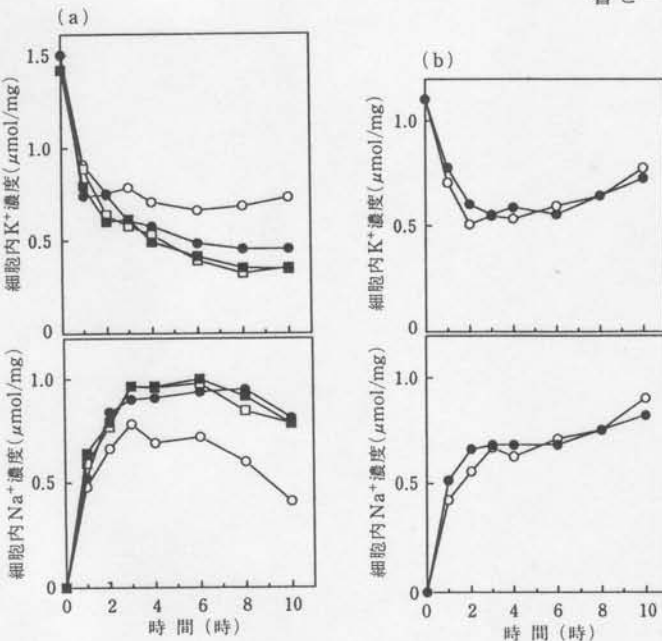


図 15. 細胞内の Na⁺ および K⁺ 濃度に及ぼす FK506 の効果

(a) 野生株 (○, ●), $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株 (□, ■) を 1 $\mu\text{g/ml}$ の FK506 を含む (●, ■) または含まない (○, □) NaCl 培地に移したときの細胞内 Na⁺ および K⁺ 濃度の変動。(b) 1 $\mu\text{g/ml}$ の FK506 を含む (●) または含まない (○) 高 NaCl 培地における $fkb1$ 株の細胞内 Na⁺ および K⁺ 濃度の変動。

50 mM LiCl が存在すると $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株の増殖量は野生株の約 20% に抑えられる。ここに 1 $\mu\text{g/ml}$ の FK506 を添加すると野生株の生育は破壊株と同じレベルまで阻害された。LiCl 存在下の FK506 による生育阻害 (野生株) は 0.025 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度からみられ (通常の YPD 培地で生育阻害が表われるのは 10 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度), $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株の LiCl を含む培地での増殖はそれ以上に FK506 による阻害を受けることはなかった。次に FK506 の阻害作用が $FKB1$ によりコードされる結合蛋白質を介して行なわれているかを検証するため, $\Delta fkb1$ 株を構築して FK506 の生育阻害効果を調べた (図 14 a)。 $\Delta fkb1$ 株の LiCl 存在下の生育は FK506 による阻害を受けなかったことから, FK506 の作用は FKBP 依存的であることが示された。0.85 M NaCl 存在下にも同様な FK506 の阻害効果が得られた。さらに, 0.85 M NaCl 存在下での細胞内 Na⁺ および K⁺ 濃度に対する FK506 の効果について調べた (図 15)。FK506 の添加により, 野生株の細胞内イオン濃度の挙動は $\Delta cnp1 \Delta cnp2$ 二重破壊株のそれと一致した。また $\Delta fkb1$ 株では FK506 の効果が表われなかった。これらの結果は, 平板培地上での増殖に対する影響と一致する。以上に述べた実験から, FK506 が

FKBP を介して PP2B を阻害することによって受ける生理機能の障害は, 酵母から高等生物に至るまで真核生物によく保存された共通のメカニズムによっていることが示唆された。また最近, α 因子による増殖停止からの復帰にも関与していることが報告されている²⁰⁾。

おわりに 筆者らは, 細胞内 Ca²⁺ 情報伝達系を解明する目的で, 遺伝学的に分析可能な出芽酵母を用いて, カルモデュリンに注目し, カルモデュリン結合蛋白質である PP2B をコードする遺伝子を取得し解析を行ってきた。PP2B は最近, 動物において免疫情報伝達の鍵酵素として注目されている。しかしながら, 遺伝学的解析が困難な動物においては, 複数の経路が複雑にからみあっている情報伝達系に関与する因子を同定し, その因果関係を解明するには困難が予想される。そ

れゆえに、モデル系としての酵母の PP2B 情報伝達経路への期待は大きい。

今回筆者らは、酵母 PP2B がさまざまなストレス、とくに高 NaCl ストレスに適応するための細胞内イオン濃度の調節に重要な役割を担うこと、そして、この系が FKBP 依存的に FK506 によって阻害されることを明らかにした。酵母の PP2B が、イオンのホメオスタシスに関与するという今回の結果は、動物において PP2B が脳神経系に多く含まれ、そこにおける情報伝達に重要な役割を果たしているのではないかと予想される点からも、非常に興味ある知見である。酵母が α 因子による増殖の G₁ 停止から回復し、増殖を再開する際に PP2B が必要なことは、このプロセスが T 細胞活性化のメカニズムと似たものである可能性がある。また、酵母でも動物と同様の機構により FK506 が PP2B の生理機能を阻害するという事実は、酵母が免疫系のシグナル伝達のモデルになりうるのではないかと期待をいだかせる。酵母のストレス応答においても、もし PP2B が転写因子を制御しているのであれば、いっそうこの系の重要性は増すことになる。また FKBP は真核生物全般によく保存されていることから、この蛋白質が PP2B の活性制御を通して Ca²⁺ シグナルの伝達に重要な役割を果たしていることが予想されるが、その真の機能は不明である。FKBP の調節にかかわる内在性のリガンド (FK506 様機能をもつ物質) が存在するのとも興味深い。

現在、筆者らの研究室では PP2B の生理機能のうち、とくに重要と考えられる以下の点に焦点をあて解析を進めている：

- (1) PP2B 破壊株の表現型を抑圧する遺伝子の解析による、PP2B より下流の機構
 - (2) FK506-FKBP 複合体による PP2B 活性阻害の機構
 - (3) ストレスシグナルによる PP2B 活性化の機構
- このような、酵母 PP2B の解析から得られる知見が、動物における PP2B を介する情報伝達系解明のブレークスルーになることを期待している。

文 献

- 1) Campbell, A.K. : Intracellular Calcium : Its Universal Role as Regulator, John Wiley&Sons, New York (1983)
- 2) Cheung, W.Y. : *Science*, **207**, 19-27 (1980)
- 3) Cohen, P., Klee, C.B. : Molecular Aspects of Cellular Regulation, Vol.5, Elsevier, New York (1988)
- 4) Iida, H., Yagawa, Y., Anraku, Y. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 13391-13399 (1990)
- 5) Davis, T.D., Urdea, M.S., Masiarz, F.R., Thorner, J. : *Cell*, **47**, 423-431 (1990)
- 6) Takeda, T., Yamamoto, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3580-3584 (1987)
- 7) Geiser, J.R., Tuinen, D., Brockerhoff, S.E., Neff, M.M., Davis, T.D. : *Cell*, **65**, 949-959 (1991)
- 8) Liu, Y., Yamashita, Y., Tsuchiya, E., Miyakawa T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 681-687 (1990)
- 9) Liu, Y., Ishii, S., Tokai, M., Tsutsumi, H., Ohki, O., Akada, R., Tanaka, K., Tsuchiya, E., Fukui, S., Miyakawa, T. : *Mol. Gen. Genet.*, **227**, 52-59 (1991)
- 10) Kuno, T., Takeda, T., Hirai, M., Ito, A., Mukai, H., Tanaka, C. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1352-1358 (1989)
- 11) Cyert, M.S., Kunisawa, R., Kaim, D., Thorner, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7376-7380 (1991)
- 12) Cyert, M., Thorner, J. : *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3460-3469 (1992)
- 13) Klee, C., Draetta, G.F., Hubbard, M.J. : *Adv. Enzymol.*, **61**, 149-200 (1988)
- 14) Nakamura, T., Tsutsumi, H., Mukai, H., Kuno, T., Miyakawa, T. : *FEBS Lett.*, **309**, 103-106 (1992)
- 15) Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Hirokawa, T., Miyakawa, T. : *EMBO J.*, **12**, 4063-4071 (1993)
- 16) Liu, J., Farmer, Jr. J.D., Lane, W.L., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L. : *Cell*, **66**, 807-815 (1991)
- 17) O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Neill, E.A. : *Nature*, **357**, 692-694 (1992)
- 18) Clipstone, N.E., Crabtree, G.R. : *Nature*, **357**, 695-697 (1992)
- 19) Siekierka, J.J., Wiederrecht, G., Grulich, H., Boulton, D., Jung, S.H.Y., Cryan, P., Hodges, P.J., Sigal, N.H. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 21011-21015 (1990)
- 20) Foor, F., Parent, S.A., Morin, N., Dahl, A.M., Ramadan, N., Chrebert, G., Bostian, K.A., Nielsen, J.B. : *Nature*, **360**, 682-684 (1992)